

This chromatographic system according to JONES and HEATHCOTE (8) was used, due to its high resolving power; even *leucine* and *isoleucine* are separated. The replacement of cellulose by *purified* cellulose (6) has only a minor influence on the separation (cf. Fig. 1 and Ref. (8)). On the other hand, the use of *purified* cellulose (6) has been found advantageous if *rechromatography* (i. e. chromatography in several systems: *multidimensional-Chromatography*) or *reflectance spectroscopy* of DNP-amino acids formed on the layer is to be carried out (4, 9). Moreover, the *non-destructive* detection technique described in this paper allows the *reaction chromatography* of amino acids (3, 4); i. e. conversion of amino acids into

DNP-derivatives *at the origin* followed by *one* or *two-dimensional* separation of DNP-compounds formed, or *one-dimensional* chromatography of amino acids followed by treatment with DNFB and chromatography of DNP-derivates formed *in situ* in the *second dimension*. These techniques, which allow the *more unambiguous* identification of amino acids, especially from biological sources, are reported elsewhere (4). The application of *non-destructive* detection techniques in sequence analysis of peptides and in the analysis of amino acids in biological material (e. g. urine or blood) will be described in a subsequent paper.

### References

1. PATAKI G. and K. T. WANG, J. Chromatogr., in press. —
2. PATAKI, G., J. Chromatogr. 16, 541 (1964). — 3. PATAKI, G., 3rd. Symposium on Chromatography and Electrophoresis, Presses Académiques Européennes, Brussels 1966, in press. —
4. PATAKI, G., J. BORKO, H.-CH. CURTIUS and F. TANCREDI, Chromatographia, in press. — 5. PATAKI, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, W. de Gruyter & Co., Berlin (1966); Techniques of Thin-Layer Chromatography in Amino Acid and Peptide Chemistry, Ann Arbor Science Publ. Inc., Ann Arbor (1968). — 6. PATAKI, G., J. Chromatogr. 29, 126 (1967). — 7. PATAKI, G., in Advances of Chromatography (editors: C. Giddings and R. A. Keller), Volumen 7, Dekker, New York, in press. — 8. JONES, K. and J. G. HEATHCOTE, J. Chromatogr. 24, 106 (1966). — 9. PATAKI, G., Chromatographia, in press.

Dr. G. Pataki  
Robapharm Ltd.  
Basle, Switzerland

## Saure Glycosaminoglycane des normalen und cirrhotischen Leberbindegewebes vom Menschen

Von A. DELBRÜCK

Medizinische Hochschule, Zentrallaboratorium am Krankenhaus Oststadt, Hannover

(Eingegangen am 10. Juni 1968)

Es wird über ein Verfahren zur Isolierung saurer Glycosaminoglycane aus Lebergewebe vom Menschen und die Auftrennung in ihre Einzelkomponenten berichtet. Dabei ergibt sich, daß etwa 90% der sauren Glycosaminoglycane des normalen Leberbindegewebes zu etwa gleichen Teilen aus Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat bestehen. Die cirrhotische Leber zeigt einen starken Anstieg dieser Komponenten bei gleichzeitig hohem Gehalt an Hyaluronat. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die angewandte Methodik und die pathophysiologische Aussage diskutiert.

### *The acidic glycosamine glycans in the connective tissue of normal and cirrhotic human liver*

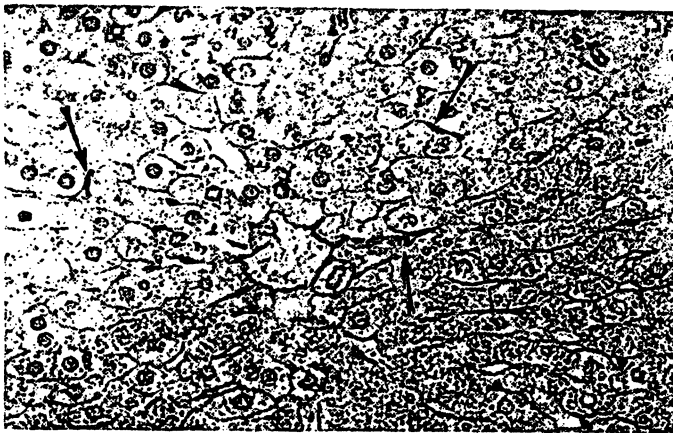
A method is reported for the isolation of acidic glycosamine glycans from human liver, and their separation into individual components. It was found that approximately equal quantities of heparan sulphate and dermatan sulphate together account for about 90% of the acidic glycosamine glycans of normal liver. These components are markedly increased in cirrhotic liver, and there is also a high concentration of hyaluronate. The methods used and the patho-physiological significance of the results are discussed.

Den sauren Glycosaminoglycanen kommt eine wesentliche Bedeutung für die Struktur und Funktion der Interzellularsubstanz der Bindegewebe zu. Ihre qualitative und quantitative Verteilung bestimmt in den verschiedenen Bindegeweben die für deren spezifische Funktionen typischen physikalisch-chemischen Eigenschaften.

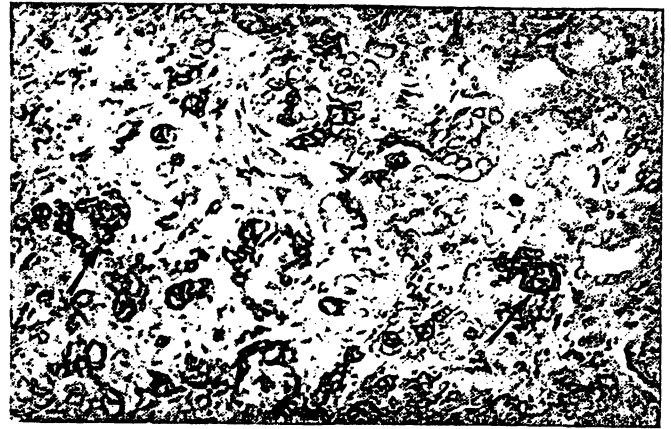
<sup>1)</sup> *Abkürzungen:* saure GAG (s. GAG) = saure Glycosaminoglycane; CPC = Cetylpyridiniumchlorid; DS = Dermatan-Sulfat; HPS = Heparan-Sulfat; HP = Heparin; CH-4-S = Chondroitin-4-Sulfat; CH-6-S = Chondroitin-6-Sulfat; CHS = Chondroitinsulfate; Hyal = Hyaluronat.

Die sauren Glycosaminoglycane als Komponenten der interzellulären Struktursubstanz werden damit zu Parametern, welche durch ihre Verteilungsmuster den jeweiligen Zustand der Gewebe zu charakterisieren vermögen. Physiologische und pathophysiologische Prozesse am Bindegewebe gehen mit qualitativen und quantitativen Veränderungen der Verteilungsmuster saurer Glycosaminoglycane einher (1—13).

Die Lebercirrhose ist geprägt durch eine unkontrollierte Proliferation des Bindegewebes, die u. a. mit dem Auftreten reifer kollagener Fasern an Stelle des feinen reticulären Fasergerüsts und einer Vermehrung der



a



b

Abb. 1

Glycosaminoglycane in normalem und cirrhotischem Leberbindegewebe. Experimentelle Lebercirrhose, Ratte, Thioacetamidfütterung. PAS-Färbung nach Amylasebehandlung, 240fach  
a) Leber ohne Thioacetamidfütterung b) Leber nach 37 Wochen Thioacetamidfütterung. PAS-positives Material im Bild dunkel gefärbt

sauren Glycosaminoglycane (Abb. 1) verbunden ist (14). Um über die pathogenetische Bedeutung der sauren GAG<sup>1)</sup> für die Bindegewebsneubildung, insbesondere auch im Zusammenhang mit dem Auftreten atypischer Faserproteine im Mesenchym der Leber Aufschluß zu erhalten, ist die qualitative und quantitative Analyse der Fraktionen der sauren GAG erforderlich. In der Literatur fehlen bislang schlüssige Angaben zu dieser Frage, obwohl eine Reihe vorwiegend histochemischer Arbeiten hierzu vorliegen (15–22). Dies hat vor allen Dingen in methodischen Schwierigkeiten seine Ursache, die sich der Isolierung dieser extrem kleinen Substratfraktionen der Leber entgegenstellen. Um auf die Frage nach der Natur und der Bedeutung der sauren GAG im normalen und pathologisch veränderten Leberbindegewebe Antwort zu erhalten, wurden die sauren GAG des Leberbindegewebes isoliert und die qualitative und quantitative Analyse ihrer einzelnen Komponenten durchgeführt.

## Material und Methoden

Die Isolierung der sauren GAG wurde aus Humanlebern (Autopsiepräparaten) durchgeführt.

Präparat III entstammt der Cirrhoseleber eines 53jährigen Mannes, der im Coma hepaticum verstarb.

Präparat V entstammt der Leber eines 55jährigen Unfalltoten.

## Pathologisch anatomische Diagnose

### Leber III:

Die portalen Felder sind vergrößert und dicht entzündlich infiltriert. Die Randzonen sind sehr unscharf begrenzt, mit kollagenfaserigen Fortsätzen in das Parenchym von Pseudolobuli. Das Leberzellbild ist sehr unruhig mit Einzelzellnekrosen, doppelkernigen und großkernigen Zellen. Mäßige mittel- bis grobtropfige Verfettung. Keine Cholestase. Es handelt sich um eine Lebercirrhose mit deutlichen Zeichen der Aktivität und Progredienz.

### Leber V:

Unauffälliger altersentsprechender Befund.

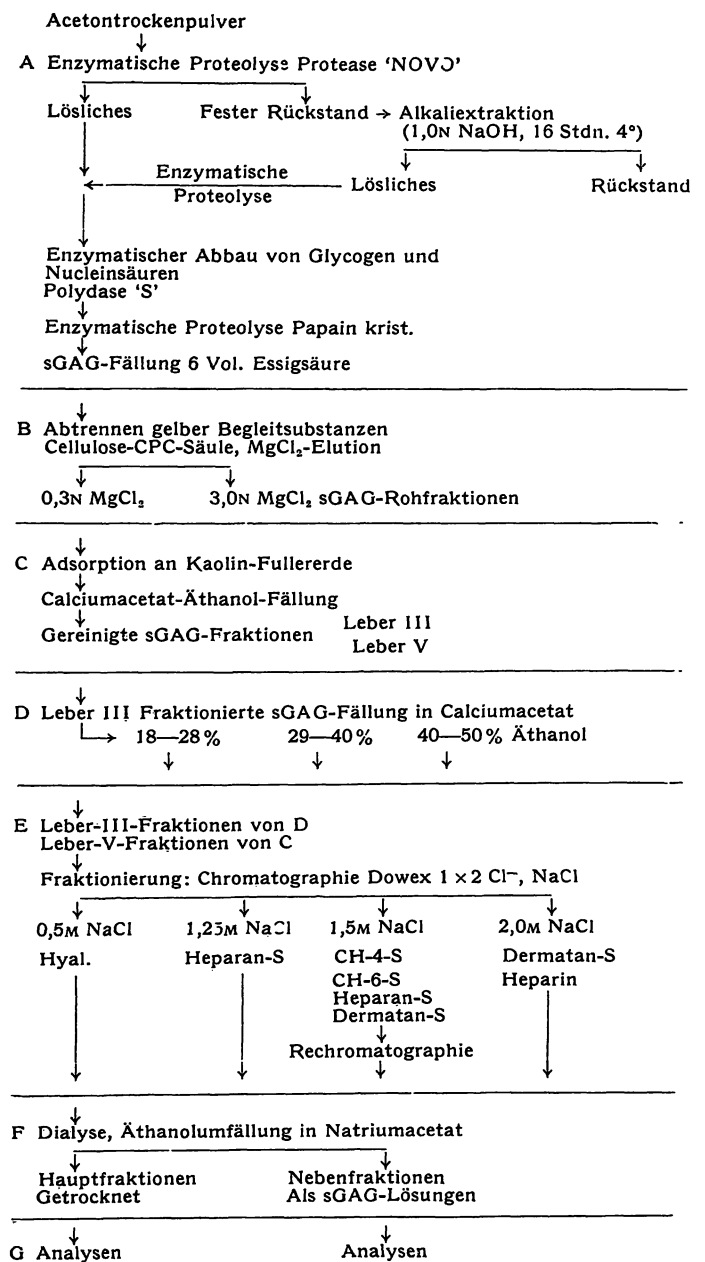


Abb. 2

Isolierungsgang saurer Glycosaminoglycane aus Menschenleber (schematisch)

### Aufbereitung des Gewebes

Das Lebergewebe wurde nach Entfernung der großen Gefäße und Bindegewebspforten mit dem Ultraturax (Janke & Kunkel, Stauffen/Breisgau, Deutschland) zerkleinert und durch mehrfache Acetonextraktion zum fettfreien Trockenpulver verarbeitet.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über den Isolierungsgang.

Der Gewebsaufschluß erfolgte unter den nachstehenden Bedingungen: *Proteolyse* durch Protease Worthington<sup>2)</sup> 160 mg/100 ml Reaktionsgemisch. Phosphat-Puffer 0,1M, pH 7,0, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Lebertrockenpulver 10 g/100 ml Reaktionsgemisch. Inkubation 6 Std. bei 50°. Toluolabdeckung.

Der verbleibende feste Rückstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt und 16 Std. bei +4° in 1N NaOH gerührt. Durch Zusatz von Eisessig wurde ein pH von 6,0 eingestellt und wie oben mit Protease verdaut und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände beider Verdauungsansätze wurden mit dem 6fachen Volumen Eisessig versetzt und 16 Std. bei +4° gehalten.

Nach Abtrennung wurde das Präzipitat in 0,05N NaOH gelöst und anschließend zum *Abbau von Glycogen und Nucleinsäuren* mit Polydase-S<sup>3)</sup> (Enzym aus *Aspergillus flavus oryzae*, enthält  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase, Protease, Nuclease) inkubiert:

Na-Acetat-Eisigsäure-Puffer 0,2M, pH 6,0. Polydase-S 800 mg/100 ml Reaktionsgemisch. Inkubation 20 Std. bei 37°, Toluolabdeckung.

Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurden zu dem Reaktionsgemisch EDTA (0,02M Endkonzentration), Cystein (5mM Endkonzentration) und kristallisiertes Papain<sup>4)</sup> 30 mg/100 ml Reaktionsgemisch zum *Abbau von Restproteinen*, insbesondere der zugesetzten Enzyme hinzugefügt.

Die aus dem Gewebe freigesetzten sauren GAG wurden mit 1,5fachem Volumen Äthanol aus dem Reaktionsgemisch gefällt. Nach Lösen der Rohfraktion in Wasser erfolgte eine weitere Fällung mit Eisessig (6fachem Volumen). Das Präzipitat wurde 5mal mit Äthanol gewaschen und nach Trocknung für die folgende Reinigung an der Cetylpyridiniumchlorid (CPC)-Cellulosesäule in Wasser gelöst.

### Trennung der sauren GAG

Die Rohfraktion wurde durch Präzipitation mit CPC<sup>4)</sup> in Anlehnung an SCOTT (23) bzw. BUDECKE (24) und langdauerndes Waschen mit 1proz. CPC und 0,1N MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Konzentrationsangabe in N entsprechend den Angaben von BUDECKE) auf Cellulosesäulen (1,5 × 35 cm, Cellulosepulver Schleicher & Schüll 123 A<sup>5)</sup>, Temperatur konstant 26°) angereichert und gereinigt (25). Die in Wasser gelöste Probe wurde in Portionen von 0,5 ml im Wechsel mit 1,0 ml/2proz. CPC auf die mit 2proz. CPC vorgewaschene Säule gegeben. Säulenkapazität für saure GAG etwa 40 mg als Glucuronsäure bestimmt. Das Präzipitat wurde zunächst mit 1proz. CPC-Lösung (etwa 200 ml) und 0,1N MgCl<sub>2</sub>-Lösung (etwa 200 ml) gewaschen, bis der Durchlauf wasserklar wurde. Die Waschflüssigkeiten wurden gesammelt und auf das Vorkommen von Keratan-Sulfat geprüft. Anschließend erfolgte die Elution der nicht sulfatierten sauren GAG mit 0,3N MgCl<sub>2</sub>-Lösung, die der sulfatierten sauren GAG mit 3,0N MgCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Fraktionen wurden mit dem 6fachen Volumen Äthanol versetzt und die präzipitierten sauren GAG durch Adsorption von Fremdstoffen an Kaolin und Fullererde<sup>6)</sup> weiter gereinigt. Die Fraktion der sulfatierten sauren GAG wurde dann nach MEYER (2) mit Äthanol in Ca-Acetatpuffer fraktioniert (18%, 25%, 40%, 50% Äthanol). Alle Fraktionen wurden anschließend an Dowex 1 × 2, Gegenion Cl<sup>-7)</sup> in Anlehnung an SCHILLER (26) und TELLER (27)

chromatographiert (Abb. 4). Nach Dialyse und Umfällungen mit Äthanol in Na-Acetat-Eisessig (2), Waschen mit Äthanol und Äther, wurden die sauren GAG der einzelnen Fraktionen über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet und analysiert:

### Analyse der sauren GAG

*Glucuronsäurebestimmung* nach DISCHE (28).

*Hexosaminbestimmung* nach ELSON-MORGAN, modifiziert nach BUDECKE (24).

Säulenchromatographische Trennung von Glucosamin und Galaktosamin mit Hilfe des Aminosäureanalyzers Unichrom (Beckman Instruments GmbH, München) Austausch PA 28, Na-Citratpuffer pH 3,25, 1—85 Min., pH 4,25, 85—200 Min.

Hydrolysebedingungen zur Hexosaminbestimmung: 2N HCl, 100°, 15 Std., in verschlossenen Ampullen unter Stickstoff.

*Orcinolreaktion* modifiziert nach BIAL (29).

*Naphthoresorcinreaktion* nach PELZER und STAIB (30).

*Sulfatbestimmung* nach DOGDSON (31) modifiziert nach GREILING (32) sowie nach BERTOLACINI (33).

Hydrolysebedingungen zur Sulfatbestimmung: 1N HCl, 105°, 4 Std., in verschlossenen Ampullen.

### Ergebnisse

Unter Anwendung der beschriebenen Verfahren gelang es, die sauren GAG aus Lebergewebe vom Menschen zu isolieren, in ihre Einzelkomponenten aufzutrennen und diese hinsichtlich ihrer Zusammensetzung qualitativ und quantitativ zu analysieren. Die Tabelle 1 faßt die Daten der drei Hauptfraktionen, Heparan-Sulfat, Dermatan-Sulfat und Hyaluronat der normalen (V) und der cirrhotischen Leber (III) zusammen.

Die Identität der einzelnen sauren GAG in den Fraktionen ergibt sich aus der Art der Teilkomponenten der Disaccharideinheiten bzw. aus dem typischen quantitativen Ausfall von Nachweisreaktionen für den Hexuronsäureanteil: Carbazol nach DISCHE, Orcinol modifiziert nach BIAL und Naphthoresorcin nach PELZER und STAIB ausgedrückt als Quotient der Meßwerte von Carbazol : Orcinol (C/O) und Carbazol zu Naphthoresorcin-Reaktion (C/N) (Tab. 2).

Die erste Fraktion III-S-I zeigt etwa äquimolare Verhältnisse für Uronsäure, Glucosamin und Sulfat. Die C/O- und C/N-Quotienten weisen sie als Heparan-Sulfat (2, 9, 27) aus.

Die Hexosaminanalyse ließ in dieser Fraktion nur einen Gipfel in der Glucosaminposition erkennen (Abb. 3). Auch in der entsprechenden Fraktion der Normalleber (V) finden sich die gleichen Analysendaten. Der etwas niedrigere C/N-Quotient läßt an eine Verunreinigung mit Chondroitinsulfat oder Hyaluronat denken. Das Hexosaminchromatogramm läßt eine Spur Galaktosamin erkennen. Die Dermatan-Sulfat-Fractionen der Leber III weisen ähnlich eindeutige Analysendaten auf: Annähernd äquimolare Uronsäure-Hexosamin-Sulfat-Verhältnisse und C/O- sowie C/N-Quotienten im erwarteten niedrigen Bereich. Die Hexosaminanalyse zeigt neben Galaktosamin nur Spuren im Glucosaminbereich an (Abb. 3). Die sauren GAG dieser Fraktion waren resistent gegen Testis-Hyaluronidase. Für die Normalleber (V) muß man auf Grund unseres Isolierungsganges eine Verunreinigung mit Heparin erwarten, da bei dieser Leber das Dermatan-Sulfat nicht

<sup>2)</sup> Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J. USA.

<sup>3)</sup> Schwarz Bio Research Inc., Orangeburg, N. Y., USA.

<sup>4)</sup> Theodor Schuchardt, München, Deutschland.

<sup>5)</sup> Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Deutschland.

<sup>6)</sup> Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland.

<sup>7)</sup> Dow Chemical Corp. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, Deutschland.

Tab. 1  
Trennung saurer Glycosaminoglycane aus menschlicher Leber: Hauptfraktionen

Fraktion	Trockengew. mg	Uronsäure	Glucosamin	Galaktosamin	Sulfat	C/O	C/N	HY'ASE verdaubar
II-S-I Heparan-S Cirrhose Leber	35,19	a 28 b 1	22,5 b 0,8	⊖	a 11,2 b 0,8	3,0	10,9	⊖
V-30-125 Heparan-S Normal Leber	6,16	a 21,5 b 1	a 20,8 b 0,97	Spur	a 12,2 b 1,18	3,25	8,7	⊖
III-S-IV Dermatan-S Cirrhose Leber	31,63	a 28,8 b 1	Spur	a 20 b 0,7	a 16 b 1,14	0,6	0,66	⊖
III-S-VI-200 Dermatan-S Cirrhose Leber	8,7	a 34 b 1	Spur	a 37 b 1,1	a 14 b 0,97	0,53	0,75	⊖
V-30-200 Heparin 10% Dermatan-S 90% Normal Leber	13,2	a 21 b 1	a 21 b	0,9	a 16,7 b 0,75 1,17	0,63	0,8	⊖
III-03-050 Hyaluronat Cirrhose Leber	16,5	a 29,2 b 1	a 28,1 b 0,96	Spur	a 0,6 b 0,025	1,0	2,5	+

a = Gehalt in Prozent des Trockengewichtes.

b = Molares Verhältnis bezogen auf Uronsäure = 1 Mol.

HY'ASE = Testis-Hyaluronidase.

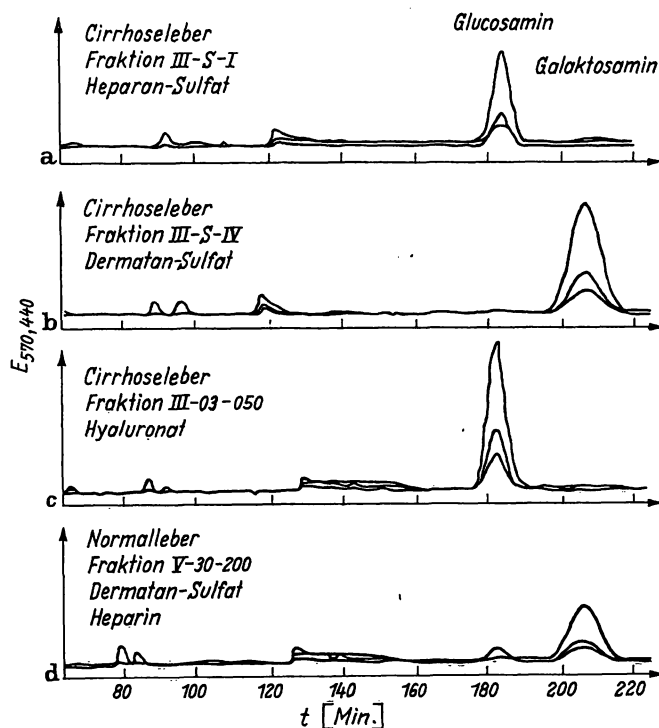


Abb. 3

Hexosamintrennung an Hydrolysaure saurer Glycosaminoglycane (Unichrom, Beckman) Versuchsbedingungen siehe Text  
a) Cirrhoseleber, Heparan-Sulfat-Fraktion  
b) Cirrhoseleber, Dermatan-Sulfat-Fraktion  
c) Cirrhoseleber, Hyaluronat-Fraktion  
d) Normalleber, Dermatan-Sulfat-Heparin-Fraktion

über die Alkoholfractionierung gewonnen wurde. In der Tat findet sich im Hexosaminchromatogramm etwa 10% Glucosamin neben Galaktosamin (Abb. 3). Dieses Verhältnis wurde für die Korrektur der Uronsäure- bzw. Sulfatwerte zugrunde gelegt. Die C/O- bzw. C/N-Quotienten sind durch den geringen Heparinanteil praktisch nicht beeinflusst.

Die letzte Fraktion, mengenmäßig nur in der Cirrhose-Leber (III) ins Gewicht fallend, muß als Hyaluronat angesprochen werden. Der Sulfatwert liegt an der unteren Nachweisgrenze, die C/O- und C/N-Quotienten

Tab. 2  
Carbazol/Orzinol (C/N)- und Carbazol/Naphtioresorcin (C/N)-Quotienten saurer Glycosaminoglycane (in Anlehnung an 2, 9, 27)

Saure GAG	C/O	C/N
Heparan-Sulfat	~2-3	~11
Dermatan-Sulfat	~0,5	~0,6
Chondroitin-4-Sulfat	~1	~10
Chondroitin-6-Sulfat	~1	~3
Hyaluronat	—	~8
Heparin	—	~8

entsprechen den für Hyaluronat zu erwartenden Größen. Das Hexosaminchromatogramm läßt nur Glucosamin erkennen. Diese Fraktion ist durch Testis-Hyaluronidase abbaubar (Abb. 3).

Während die Hauptfraktionen bei der Cirrhose-Leber (III) 97%, bei der Normal-Leber (V) 82% der Gesamt-Glycosaminoglycane umfassen, spielen die Nebenfraktionen quantitativ kaum eine Rolle. Sie sind, wie aus Tabelle 3 ersichtlich, vorwiegend Mischfraktionen. Eine weitere Fraktionierung der Substanz scheiterte an der geringen Menge des vorliegenden Materials. Auf ein Vorkommen von Chondroitin-4- bzw. -6-Sulfat weisen in den Fraktionen III-S-VI-150 und V-30-150-160 die Positionen der sauren GAG im Dowex-Chromatogramm und die Hexosaminanalysen bei nicht aussagefähigen C/O- und C/N-Quotienten hin. Der Hyaluronatanteil der Leber V (V-30) ist verschwindend gering.

Daraus ergibt sich, daß Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat als die sauren Glycosaminoglycane des Leberbindegewebes angesehen werden müssen, welche etwa 90% der Gesamt-Glycosaminoglycuronoglycane ausmachen. Ob, und in welchem Ausmaß Chondroitinsulfate vorkommen, muß vorerst dahingestellt bleiben. Unsere Untersuchungen sprechen gegen eine wesentliche Rolle dieser sauren Glycosaminoglycane in der Grundsubstanz des Leberbindegewebes.

In der cirrhotischen Leber findet sich eine starke Vermehrung der beiden Hauptfraktionen Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat (Tab. 4) — in dem untersuchten Material etwa das 5fache der Vergleichsleber — und

Tab. 3  
Trennung saurer Glycosaminoglycane aus Leber vom Menschen: Nebenfraktionen  
Auf die Bestimmung des Trockengewichtes mußten wir verzichten, da hier kein Material mehr verfügbar war

Organ	Fraktion	Uronsäure µg	Glucosamin µg	Galactosamin µg	Sulfat µg	C/O	C/N	Anteil an Gesamt sGAG	sGAG****
Cirrhoseleber	III-S-VI-125	82 ml**	54 ml	Spur	KM	2,3	9,2	etwa 3%	HPS DS, CHS HPS, HYAL DS, HPS DS, HP
	III-S-VI-150	50 ml	KM*	KM	KM	0,78	2,3		
	III-03-125	311 mg***	247 mg	Spur	40 mg	1,37	4,0		
	III-03-160	52 ml	8,6 ml	10 ml	KM	0,83	KM		
	III-03-200	70 ml	16 ml	94 ml	KM	0,44	1,3		
Normalleber	V-03	56 ml	KM	KM	KM	0,82	2,7	etwa 18%	HYAL Rechrom. HPS (HYAL) HPS, CHS DS, HP
	V-30-150	285 mg	32 mg	77 mg	KM	1,9	2,4		
	V-30-150-125	285 mg	137 mg	Spur	KM	0,82	6,8		
	V-30-150-160	285 mg	124 mg	96 mg	KM	1,6	2,2		
	V-30-150-200	285 mg	39 mg	157 mg	KM	1,09	0,78		

\* Kein Material mehr verfügbar.

\*\* Bezug auf ml soweit GAG als Trockenpulver nicht vorhanden.

\*\*\* Bezug auf mg Trockengewicht der Fraktion.

\*\*\*\* Nach den Daten wahrscheinliche sGAG-Komponenten.

Tab. 4  
Verteilung saurer Glycosaminoglycane in normaler und cirrhotischer menschlicher Leber\*

sGAG	Hyaluronat	Heparan-S	Chondr.-4-S Chondr.-6-S	Dermatan-S	Heparin	Gesamt- sGAG	sGAGmg/ g Tr.-Gew.
mg Normal	Spur	4,1	0,4	6,22	0,6	11,32	0,035
%		36	3,5	55,2	5,3		
mg Cirrhose	12,8	21,7	Spur	26,6	Spur	63,1	0,224
%	20	34		46			

\* Berechnet nach dem Hexosamingehalt.

Tab. 5  
Verteilungsmuster saurer Glycosaminoglycane in verschiedenen Bindegeweben (1—13)

	Knorpel	Sehne	Fas- cie	Cornea	Glas- körper	Zonula Zinnii	Synov- ia	Ge- fäße	Herz- klappe	Mesenchymales Gewebe					
										Uterus	Niere	Leber	Lunge	ZNS	Haut
Hyaluronat		(+)	(+)		+	+	+	(+)	(+)			(+)		+	(+)
Chondroitin				+											
Chondroitin-4-Sulfat	+			+				+		+	?			+	
Chondroitin-6-Sulfat	+	+	+			+		+	+		?				
Dermatan-Sulfat		+	+					+	+		?	+		?	+
Heparan-Sulfat								+		+	+	+	+	?	+
Keratan-Sulfat	+			+											

+ : Hauptkomponenten.

(+): Nebenkomponten.

?: Befunde widersprüchlich.

ein hoher Anteil von Hyaluronat (20%). Eine qualitative Änderung des Verteilungsmusters der sauren GAG in der cirrhotischen Leber mit Auftreten anderer Komponenten wurde nicht beobachtet. Keratan-Sulfat wurde weder in der normalen noch in der cirrhotisch veränderten Leber gefunden.

### Diskussion der Ergebnisse

Für die präparative Darstellung der sauren Glycosaminoglycane aus dem Leberbindegewebe ist der Aufschluß der im Vergleich zum Anteil der sauren GAG — (100 mg) extrem großen Gewebsmenge (1500 g) von ausschlaggebender Bedeutung. Einerseits ist, um eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, ein optimaler Aufschluß des Gewebes erforderlich, andererseits muß so schonend vorgegangen werden, daß keine Veränderungen der Struktur der sauren GAG induziert werden. Gleichzeitig besteht die Notwendigkeit, die minimale Konzentration der sauren GAG im Ausgangsmaterial so anzureichern, daß sie einer weiteren Reinigung durch die klassischen Fällungsmethoden

oder durch chromatographische Verfahren unterzogen werden können. In dem enzymatischen Aufschluß, der sich als die Methode der Wahl für die geforderten Isolierungsbedingungen erwies, wurde eine Alkaliextraktion des ersten Proteolysatrückstandes eingeschaltet, die eine wesentliche Verbesserung der Ausbeute ergab. Eine abschließende Proteolyse mit kristallisiertem Papain ermöglicht es, vor allen Dingen die durch Protease- und Polydasezusatz vorhandenen Proteine mit einer minimalen Enzymeiweißmenge abzubauen. Ein wesentlicher Schritt in der Präparation ist die Fällung der sauren GAG mit Cetylpyridiniumchlorid auf einer Cellulosesäule, wobei zugleich durch fraktioniertes wechselweises Auftragen von Probe und 2proz. CPC-Lösung eine erhebliche Anreicherung des Materials erzielt wurde. Das auf der Oberfläche der Cellulose fein verteilte Präzipitat konnte durch Waschen mit großen Volumina 1proz. CPC-Lösung und 0,1N MgCl<sub>2</sub> von Verunreinigungen, besonders von gelben Farbstoffen, weitgehend befreit werden. Für die Isolierung der Einzelkomponenten der sauren GAG hat sich die vorherige Abtrennung der Dermatan-

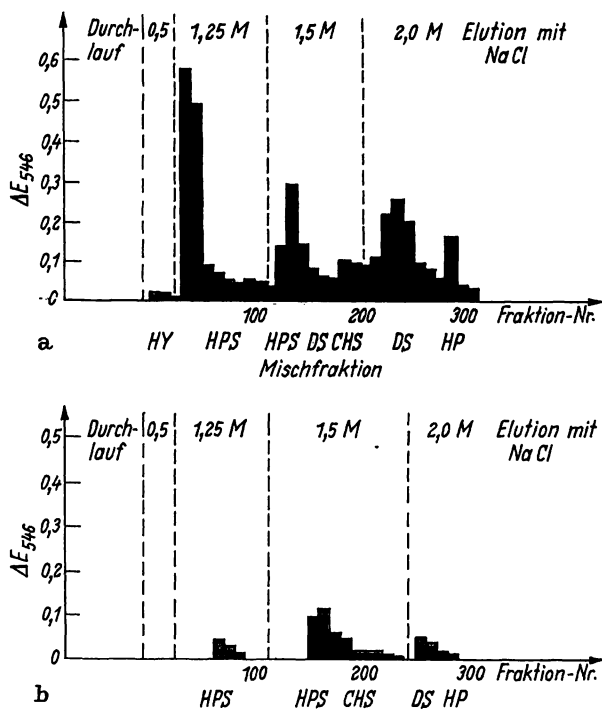


Abb. 4

a) Chromatographie sulfatierter saurer Glycosaminoglycane an Dowex 1 x 2, Cl<sup>-</sup> Form, Normalleber (Mensch) GAG vorgereinigt 10 ml Fraktionen, Geschwindigkeit 10 ml/Std.  
 b) Rechromatographie der Mischfraktion Versuchsbedingungen wie unter a)

Sulfat-Fraktion durch Äthanol-fällung in Ca-Acetatpuffer als zweckmäßig erwiesen, da eine alleinige Auftrennung auf Dowex 1 x 2 Cl<sup>-</sup> zu keiner scharfen Trennung von Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat (Frakt. V, Abb. 4) wie von Dermatan-Sulfat und Heparin führt.

Die durch Äthanolpräzipitation gewonnene Dermatan-Sulfat-Fraktion (Abb. 2) war nahezu frei von anderen sauren GAG, die sich ihrerseits nach Abtrennung des Dermatan-Sulfates recht gut durch Kationenaustauscherchromatographie auftrennen ließen.

Die qualitativen und quantitativen Analysen der gewonnenen Fraktionen (Tab. 1 und 3) zeigen, daß Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat rund 90% der im Leberbindegewebe gefundenen sauren GAG ausmachen. Das Verteilungsmuster der sauren GAG der Leber fügt sich recht gut in das Bild anderer Organmesenchyme (Tab. 5), die fast ausnahmslos Heparan-Sulfat als eine Hauptkomponente aufweisen. Auch Dermatan-Sulfat ist fast obligat.

Es ist bemerkenswert, daß auch die Gefäße (Tab. 5), die Angaben stützen sich jedoch fast ausnahmslos auf die Aorta, als Hauptkomponenten Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat aufweisen. Es liegt nahe, hierin eine enge Verwandtschaft des Mesenchyms parenchymatöser Organe zum Gefäßbindegewebe zu sehen, obwohl diese Aussage insofern eine Einschränkung erfährt, als experimentelle Daten über das Verteilungsmuster saurer GAG mittlerer und kleiner Arterien und der Venen bisher nicht vorliegen.

Das Auftreten eines anderen Fasertypes im Verlauf der unkontrollierten Proliferation des Bindegewebes bei der Lebercirrhose — kollagene statt reticuläre Fasern —

läßt daran denken, daß eine qualitative Änderung in der Grundsubstanz mit diesem Prozeß verknüpft sei, da die extrazelluläre Faserbildung aus den Vorstufen u. a. durch saure GAG beeinflusst werden kann (34, 35). Eine qualitative Änderung des Verteilungsmusters saurer GAG im Verlauf der Cirrhosebildung muß jedoch auf Grund der dargelegten Ergebnisse als Ursache für das Auftreten reifer Kollagenfibrillen im Lebermesenchym ausgeschlossen werden. Die Vermehrung und Ausbildung kollagener Faserstrukturen geht lediglich mit einer annähernd gleichmäßigen Zunahme der Hauptfraktionen Dermatan-Sulfat und Heparan-Sulfat sowie einem erheblichen Anstieg der Hyaluronat-Fraktion einher (Tab. 4).

Dieser auffällig hohe Hyaluronatgehalt des Bindegewebes der cirrhotischen Leber läßt die Frage berechtigt erscheinen, ob diese Fraktion einer nicht-sulfatierten Heparan-Sulfat-Vorstufe entspricht, deren Disaccharideinheit formal chemisch mit der des Hyaluronates identisch ist und die als Ausdruck der starken Proliferation des Bindegewebes stark vermehrt erscheint. Gegen eine solche Annahme spricht die Verdaubarkeit dieser sauren GAG-Fraktion durch Testis-Hyaluronidase, welche typisch für Hyaluronat, ein Kettenmolekül, ist, aber bei dem verzweigten Makromolekül des Heparan-Sulfates nicht gefunden wird. Weiterhin erscheint der Anteil dieser Fraktion in der Leber zu groß, um ihr die Rolle einer Heparan-Sulfat-Vorstufe zuweisen zu können, zumal eine vergleichbare nicht sulfatierte galaktosaminhaltige Fraktion entsprechend der Dermatan-Sulfat-Vorstufe nicht gefunden werden konnte. Der hohe Hyaluronatgehalt der Cirrhoseleber steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß generell eine Vermehrung des Hyaluronates in proliferierenden Geweben auftritt. SCHALLOCK (36) spricht in diesem Zusammenhang von dem Hyaluronat als dem Wegbereiter der Proliferation. In experimentellen Granulomen fand SLACK (37) bis zu 50% der Gesamtglycosaminoglycureonoglycane als Hyaluronat. Einen Anstieg der Hyaluronatfraktion beobachteten wir auch schon in früheren Untersuchungen an Rattenleber bei Tieren, die einer chronischen Vergiftung mit Thioacetamid unterworfen waren (38, 39). Im Gegensatz zu der hier dargelegten Beobachtung an Menschenleber war dieser Anstieg in etwa gleichem Verhältnis zu den anderen Glycosaminoglycureonoglycanen erfolgt. Auch BECKER (40) bestätigt diese Befunde. TANAKA (20, 41) der durch akute Tetrachlorkohlenstoffvergiftung eine Cirrhose in Rattenlebern erzeugte, sah eine dem Anstieg der Chondroitinsulfate vorangehende Vermehrung des Hyaluronates, ein Befund, der die oben angeführte These über die Bedeutung des Hyaluronates für die Proliferation unterstützt.

Durch die Isolierung der sauren GAG ist es gelungen, das Verteilungsmuster dieser Bestandteile der Bindegewebsgrundsubstanz menschlicher Leber darzustellen. Die unkontrollierte Proliferation des Bindegewebes im Verlauf der Lebercirrhose geht mit einer starken,

gleichmäßigen Vermehrung der für die normale Leber typischen sauren GAG Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat einher. Der erhebliche Anstieg des Hyaluronates zeigt auch bei diesem mit einer Neubildung von Bindegewebe verbundenen Prozeß die pathogenetische Bedeutung dieser Fraktion für die Proliferation von Bindegewebe. Das Fehlen von Chondroitin-4- und Chondroitin-6-Sulfat auch in der cirrhotischen Leber läßt erkennen, daß eine Umbildung retikulärer in kollagene Faserstrukturen in einem Grundsubstanzmilieu vonstatten geht, das lediglich Heparan-Sulfat und Dermatan-Sulfat, beide allerdings vermehrt enthält. Die pathogenetische Bedeutung des Verhaltens saurer GAG im Verlauf der Cirrhosebildung erscheint damit vorerst durch die quantitativen Veränderungen sulfatierter saurer GAG gekennzeichnet. Es muß jedoch

in Betracht gezogen werden, daß die sauren GAG im Bindegewebe als GAG-Proteinkomplexe vorliegen, die, wie SCHUBERT (35) zeigte, einen besonderen Einfluß auf die Fibrillogenese nehmen. Es ist weiteren Untersuchungen vorbehalten, GAG-Proteinkomplexe aus dem Bindegewebe cirrhotischer Lebern zu isolieren, um die gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf die pathogenetische Bedeutung von Strukturveränderungen der Heparan-Sulfat- bzw. Dermatan-Sulfat-Proteinkomplexe zu vertiefen.

Der Autor ist Herr Dr. med. TREBBIN, Pathologisches Institut am Krankenhaus Nordstadt der Landeshauptstadt Hannover, für die Überlassung des Materials und der pathologisch-histologischen Untersuchungsergebnisse zu großem Dank verpflichtet. Der Verfasser dankt Frau HELGA BECKER und Frau FRIEDRIKE HAEUSSLER für sorgfältige technische Mitarbeit.

### Literatur

- MEYER, K. *Federat. Proc.*, 17, 1074 (1958).
- MEYER, K., E. DAVIDSON, A. LINKER und PH. HOFFMANN, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 21, 506 (1956).
- BUDDECKE, E., *J. Atheroscl. Res.* 2, 32 (1962).
- BUDDECKE, E. und M. SZIEGOLEIT, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 337, 66 (1964).
- KAPLAN, D. und K. MEYER, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 105, 78 (1960).
- MORETTÉ, A. und M. W. WHITEHOUSE, *Biochem. J.* 87, 396 (1963).
- LOEWI, G. und K. MEYER, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 27, 453 (1958).
- LOEWI, G. und R. CONSDEN, *Nature* (London) 195, 148 (1962).
- BEIER-WALTERS, W. H. und A. J. BOLLET, *J. clin. Invest.* 38, 945 (1959).
- SKY-PECK, H. H., *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 130, 951 (1966).
- SZABO, M. M. und E. ROBÓZ-EINSTEIN, *Arch. Biochem. Biophysics* 98, 406 (1962).
- HALLÉN, A., *Acta chem. Scand.* 12, 1869 (1958).
- BRIMACOMBE, J. S. und J. M. WEBBER, *Mucopolysaccharides*, *Biochim. biophys. Library*, Vol. 6, Elsevier Publishing Co. Amsterdam (1966).
- HARTMANN, F., *Gastroenterologia Basel Suppl. ad Vol. 97*, 210 (1962).
- GALAMBOS, J. T., *Clin. Res.* 9, 57 (1963).
- GALAMBOS, J. T., *Gastroenterology* (Baltimore) 51, 65 (1966).
- RUBIN, E., *J. Histochem. Cytochem.* 14, 689 (1966).
- MIHAESCO, E. und C. MIHAESCO, *Experientia* (Basel) 21, 598 (1965).
- ITO, J., *Kumamoto Med. J.* 17, 67 (1964).
- TANAKA, Y., *Kurume Med. J.* 10, 112 (1963).
- KIMOTO, E., Y. TANAKA und S. HANASHIRO, *Kurume Med. J.* 5, 93 (1958).
- WOHLGEMUTH, B., *Naturwissenschaften* 52, 643 (1965).
- SCOTT, J. E., S. GARDELL und J. M. NILSON, *Biochem. J.* 67, 7P (1957).
- BUDDECKE, E., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 318, 33 (1960).
- DELBRÜCK, A., *diese Z.* 5, 10 (1967).
- SCHILLER, S., G. A. SLOVER und A. DORFMAN, *J. biol. Chemistry* 236, 983 (1961).
- TELLER, W. und A. ZIEMANN, *Klin. Wschr.* 44, 1142 (1966).
- DISCHE, Z., *J. biol. Chemistry* 167, 189 (1947).
- BIAL, M., *Dtsch. Med. Wschr.* 28, 253 (1902).
- PELZER, H. und W. STAIB, *Clin. chimica Acta* (Amsterdam) 2, 407 (1957).
- DODGSON, K. S., *Biochem. J.* 78, 312 (1961).
- GREILING, H., in Bartelheimer, H., W. Heyde und W. Thorn Ed.: *D-Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie* S. 158, F. Enke Verlag Stuttgart (1966).
- BERTOLACINI, R. J. und J. E. BARNEY, *Analytic. Biochemistry* 29, 281 (1957).
- HARTMANN, F. und C. HIRAYAMA, *Acta hepat.splenol.* 8, 102 (1961).
- DISALVO, J. und M. SCHUBERT, *Biopolymers* 4, 247 (1966).
- SCHALLOCK, *Persönliche Mitteilung*.
- SLACK, H. G. B., *Biochem. J.* 69, 125 (1958).
- ARNOLD, H., A. DELBRÜCK und F. HARTMANN, *Dtsch. Arch. klin. Med.* 209, 92 (1963).
- DELBRÜCK, A. und F. HARTMANN, *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 70, 951 (1964).
- BECKER, K., *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 73, 264 (1967).
- KIMOTO, E., Y. TANAKA, Y. IMOTO und Y. NATSUSHITA, *Kurume Med. J.* 7, 97 (1960).

Priv.-Doz. Dr. A. Delbrück  
3000 Hannover  
Podbielskistr. 380

## KURZMITTEILUNGEN

### Liquid Scintillation Messung von $^{14}\text{C}$ in wäßrigen Lösungen von Fäces und Urin

*The liquid Scintillation measurement of  $^{14}\text{C}$  in aqueous solutions of faeces and urine*

Von T. H. LIPPERT und L. EHE

*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler)*

(Eingegangen am 26. April 1968)

Die Messung von  $^{14}\text{C}$  in wäßrigen Lösungen von Fäces und Urin in dem von NEWTON HAYES (1) für wäßr. Lösungen angegebenen

<sup>1)</sup> *Abkürzungen:* PPO = 2,5-Diphenyloxazol, Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenylloxazolyl)-benzol.

Liquid Scintillator (7 g/l PPO, 0,3 g/l Dimethyl-POPOP<sup>1</sup>) und 100 g/l Naphthalin in Dioxan) erwies sich als ungeeignet. Ein Grund dafür ist das Ausfällen von Salzen aus wäßr. Lösungen mit höherer anorganischer Salzkonzentration. So ist bereits bei Zugabe von  $^{14}\text{C}$  in 1 m/physiol. NaCl-Lösung zu 10 m/ Scintillator eine Ausfällung zu verzeichnen. Die Zählrate (die Messung erfolgte im Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer) fällt nach Schütteln der Probe bei dem darauffolgenden Entmischungsprozeß kontinuierlich solange ab, bis ein Gleichgewichtspunkt erreicht ist. Durch erneutes Schütteln läßt sich die Zählrate wieder erhöhen. Bei diesem Vorgang erfahren die durch externen Standard gewonnenen Quenchwerte jedoch keinerlei ausgleichende Veränderungen, wodurch eine exakte quantitative Messung der vorhandenen Radioaktivität nicht möglich ist. Eine Stabilisierung der wäßr. Lösungen von Fäces und Urin im Scintillator wurde mit Hilfe eines Gel-Systems erreicht. Als